

## 特許協力条約に基づく国際出願願書

原本(出願用)



0	受理官庁記入欄	
0-1	国際出願番号	
0-2	国際出願日	
0-3	(受付印)	
0-4	様式-PCT/RO/101 この特許協力条約に基づく国際出願願書は、	
0-4-1	右記によって作成された。	PCT-SAFE [EASY mode] Version 3.50 (Build 0002.158)
0-5	申立て 出願人は、この国際出願が特許協力条約に従って処理されることを請求する。	
0-6	出願人によって指定された受理官庁	日本国特許庁 (RO/JP)
0-7	出願人又は代理人の書類記号	A41147M
I	発明の名称	器官形成方法
II	出願人	
II-1	この欄に記載した者は	出願人である (applicant only)
II-2	右の指定国についての出願人である。	米国を除く全ての指定国 (all designated States except US)
II-4ja	名称	財団法人乙卯研究所
II-4en	Name:	RESEARCH FOUNDATION ITSUU LABORATORY
II-5ja	あて名	1580094 日本国
II-5en	Address:	東京都世田谷区玉川2丁目28番10号 28-10, Tamagawa 2-chome, Setagaya-ku, Tokyo 1580094 Japan
II-6	国籍(国名)	日本国 JP
II-7	住所(国名)	日本国 JP
III-1	その他の出願人又は発明者	
III-1-1	この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor)
III-1-2	右の指定国についての出願人である。	米国のみ (US only)
III-1-4ja	氏名(姓名)	浅島 誠
III-1-4en	Name (LAST, First):	ASASHIMA, Makoto
III-1-5ja	あて名	1700005 日本国
III-1-5en	Address:	東京都豊島区南大塚3-40-9 3-40-9, Minamitsuka, Toshima-ku, Tokyo 1700005 Japan
III-1-6	国籍(国名)	日本国 JP
III-1-7	住所(国名)	日本国 JP



## 特許協力条約に基づく国際出願願書

原本(出願用)

III-2	その他の出願人又は発明者	出願人及び発明者である (applicant and inventor) 米国のみ (US only) 浜崎 辰夫 HAMAZAKI, Tatsuo 1660001 日本国 東京都杉並区阿佐ヶ谷北 3-12-2 3-12-2, Asagayakita, Suginami-ku, Tokyo 1660001 Japan 日本国 JP 日本国 JP
III-2-1	この欄に記載した者は	
III-2-2	右の指定国についての出願人である。	
III-2-4ja	氏名(姓名)	
III-2-4en	Name (LAST, First):	
III-2-5ja	あて名	
III-2-5en	Address:	
III-2-6	国籍(国名)	
III-2-7	住所(国名)	
III-3	その他の出願人又は発明者	
III-3-1	この欄に記載した者は	
III-3-2	右の指定国についての出願人である。	
III-3-4ja	氏名(姓名)	
III-3-4en	Name (LAST, First):	
III-3-5ja	あて名	
III-3-5en	Address:	
III-3-6	国籍(国名)	
III-3-7	住所(国名)	
III-4	その他の出願人又は発明者	出願人及び発明者である (applicant and inventor) 米国のみ (US only) 首藤 紘一 SHUDO, Koichi 1680073 日本国 東京都杉並区下高井戸 5-9-18 5-9-18, Shimotakaido, Suginami-ku, Tokyo 1680073 Japan 日本国 JP 日本国 JP
III-4-1	この欄に記載した者は	
III-4-2	右の指定国についての出願人である。	
III-4-4ja	氏名(姓名)	
III-4-4en	Name (LAST, First):	
III-4-5ja	あて名	
III-4-5en	Address:	
III-4-6	国籍(国名)	
III-4-7	住所(国名)	


## 特許協力条約に基づく国際出願願書

原本(出願用)

IV-1	代理人又は共通の代表者、通知のあて名 下記の者は国際機関において右記のごとく 出願人のために行動する。	代理人 (agent)	
IV-1-1ja	名称	特許業務法人特許事務所サイクス	
IV-1-1en	Name:	SIKs & Co.	
IV-1-2ja	あて名	1040031 日本国	
IV-1-2en	Address:	東京都中央区京橋一丁目8番7号 京橋日殖ビル8階 8th Floor, Kyobashi-Nisshoku Bldg., 8-7, Kyobashi 1-chome, Chuo-ku, Tokyo 1040031 Japan	
IV-1-3	電話番号	03-3538-5680	
IV-1-4	ファクシミリ番号	03-3538-5686	
V	国の指定		
V-1	この願書を用いてされた国際出願は、規則 4.9(a)に基づき、国際出願の時点で拘束さ れる全てのPCT締約国を指定し、取得しう るあらゆる種類の保護を求め、及び該当す る場合には広域と国内特許の両方を求める 国際出願となる。		
VI-1	先の国内出願に基づく優先権主張		
VI-1-1	出願日	2003年 03月 20日 (20. 03. 2003)	
VI-1-2	出願番号	2003-077123	
VI-1-3	国名	日本国 JP	
VI-2	優先権証明書送付の請求 上記の先の出願のうち、右記の番号のもの については、出願書類の認証謄本を作成 し国際事務局へ送付することを、受理官庁 に対して請求している。	VI-1	
VII-1	特定された国際調査機関(ISA)	日本国特許庁 (ISA/JP)	
VIII	申立て	申立て数	
VIII-1	発明者の特定に関する申立て	-	
VIII-2	出願し及び特許を与えられる国際出願日 における出願人の資格に関する申立て	-	
VIII-3	先の出願の優先権を主張する国際出願日 における出願人の資格に関する申立て	-	
VIII-4	発明者である旨の申立て(米国を指定国と する場合)	-	
VIII-5	不利にならない開示又は新規性喪失の例 外に関する申立て	-	
IX	照合欄	用紙の枚数	添付された電子データ
IX-1	願書(申立てを含む)	4	✓
IX-2	明細書	16	-
IX-3	請求の範囲	2	-
IX-4	要約	1	✓
IX-5	図面	4	-
IX-7	合計	27	

## 特許協力条約に基づく国際出願願書

原本(出願用)

	添付書類	添付	添付された電子データ
IX-8	手数料計算用紙	✓	-
IX-17	PCT-SAFE 電子出願	-	✓
IX-18	その他:	納付する手数料に相当する特許印紙を貼付した書面	
IX-18	その他:	国際事務局の口座への振込を証明する書面	
IX-19	要約書とともに提示する図の番号		
IX-20	国際出願の使用言語名	日本語	
X-1	出願人、代理人又は代表者の記名押印		
X-1-1	名称	特許業務法人特許事務所サイクス 今村 正純	
X-1-2	署名者の氏名		
X-1-3	権限		

## 受理官庁記入欄

10-1	国際出願として提出された書類の実際の受理の日	
10-2	図面	
10-2-1	受理された	
10-2-2	不足図面がある	
10-3	国際出願として提出された書類を補完する書類又は図面であってその後期間内に提出されたものの実際の受理の日(訂正日)	
10-4	特許協力条約第11条(2)に基づく必要な補完の期間内の受理の日	
10-5	出願人により特定された国際調査機関	ISA/JP
10-6	調査手数料未払いにつき、国際調査機関に調査用写しを送付していない	

## 国際事務局記入欄

11-1	記録原本の受理の日	
------	-----------	--

## PCT手数料計算用紙(願書付属書)

原本(出願用)

[この用紙は、国際出願の一部を構成せず、国際出願の用紙の枚数に算入しない]

0	受理官庁記入欄			
0-1	国際出願番号			
0-2	受理官庁の日付印			
0-4	様式-PCT/RO/101(付属書)			
0-4-1	このPCT手数料計算用紙は、 右記によって作成された。	PCT-SAFE [EASY mode] Version 3.50 (Build 0002.158)		
0-9	出願人又は代理人の書類記号	A41147M		
2	出願人	財団法人乙卯研究所		
12	所定の手数料の計算	金額/係数	小計 (JPY)	
12-1	送付手数料 T	⇒	13000	
12-2-1	調査手数料 S	⇒	97000	
12-2-2	国際調査機関	JP		
12-3	国際出願手数料 (最初の30枚まで) i1	116000		
12-4	30枚を越える用紙の枚数	0		
12-5	用紙1枚の手数料 (X) 0	0		
12-6	合計の手数料 i2	0		
12-7	i1 + i2 = i	116000		
12-12	EASYによる減額 R	-8300		
12-13	国際出願手数料の合計 (i-R) I	⇒	107700	
12-17	納付すべき手数料の合計 (T+S+I+P)	⇒	217700	
12-19	支払方法	送付手数料: 特許印紙 調査手数料: 特許印紙 国際出願手数料: 銀行口座への振込み		

出願人による言及

13-1-1	出願人による言及	110000109 特許業務法人特許事務所サイクス
--------	----------	---------------------------

13-1-1	出願人による言及	110000109 特許業務法人特許事務所サイクス
13-2-3	チェック結果 氏名(名称)	Green? 出願人 1: 電話番号が記入されていません。
	チェック結果 氏名(名称)	Green? 出願人 1: ファクシミリ番号が記入されていません。
	チェック結果 氏名(名称)	Green? 代理人 1: 英文表記での名称はできるだけ大文字で記入してください。
13-2-4	チェック結果 優先権	Yellow この国際出願に対しては、国内優先権制度に関する国内法令が適用されます。日本の指定を取り下げるか、あるいは国内優先権主張を取り下げない限り、先の国内出願は、優先日から15ヶ月を経過したのち、取り下げられたものとみなされます。いずれの取下げであっても、先の出願が取り下げられる前に行われなければなりません。
13-2-7	チェック結果 内訳	Yellow! すべての出願人が願書に署名(記名押印)をしない限り、委任状又は包括委任状の写しを添付する必要があります。
	チェック結果 内訳	Green? 要約書とともに提示する図の番号が示されていません。
13-2-10	チェック結果 注釈	Green? 願書に表示しなければならない通常の項目はすべて他のPCT-EASYの機能で入力することができます。言及を用いた表示の有効性について確認してください。

## 明 細 書

## 器官形成方法

## 技術分野

本発明は脊椎動物の未分化細胞から器官を形成する方法に関する。

## 背景技術

ヒトを含めて脊椎動物の生体には非常に沢山の器官や組織が存在しているが、それらはもともと1個の受精卵から細胞分裂(卵割)と細胞分化を経て形成され、バランスのとれた体制をもつ個体を構成するようになる。このような器官及び組織形成のプロセスはきわめて複雑であり、誘導現象と呼ばれる重要な細胞間の相互作用が多段階にわたって行われていると考えられている。

生体内で行われる器官形成のプロセスを試験管内(イン・ビトロ)で再現し、未分化細胞から所望の器官を形成する試みがなされている(例えば、「未分化細胞からの臓器形成」、炎症・再生、Vol. 22, 21, 2002、脾臓の器官形成については特開 2001-299335 号公報及び特開 2001-333770 号公報を参照のこと)。例えば、イモリの胞胚期のアニマルキャップ(多能性をもった細胞塊)である未分化細胞を高濃度のアクチビンで処理するとリズムカルに拍動する心臓を 60%の形成率で形成することができる。この心臓は、1ヶ月以上も正常な拍動数を維持することができ、心筋細胞に特異的な遺伝子の発現や心筋に特異的な介在板の存在なども確認できることから、機能的及び構造的にほぼ完全な心臓であると言える。

一方、レチノイン酸(ビタミンA酸)はビタミンAの活性代謝産物であり、発生途上にある未熟な細胞を特有な機能を有する成熟細胞へと分化させる作用や、細胞の増殖促進作用や生命維持作用などの極めて重要な生理作用を有している。これまでに合成された種々のビタミンA誘導体、例えば、特開昭 61-22047 号公報や特開昭 61-76440 号公報記載の安息香酸誘導体、及びジャーナル・オブ・メディ

シナル・ケミストリー (Journal of Medicinal Chemistry, 1988, Vol. 31, No. 11, p. 2182) に記載の化合物なども、同様な生理作用を有することが明らかにされている。レチノイン酸及びレチノイン酸様の生物活性を有する上記化合物は「レチノイド」と総称されている。

レチノイン酸は前後軸に沿った胚のパターンニングに対する調節因子であり (Nature 340, 140-144, 1989、Development 112, 945-958, 1991、Dev. Biol. 192, 1-16, 1997、Zool. Sci. 15, 879-886, 1998)、このレチノイン酸がツメガエル胚における前方神経組織を後方化させ、中胚葉の発達において影響を及ぼすことが知られている (Genes Dev. 5, 175-187, 1991、Develop. Growth. Differ. 35, 123-128, 1993)。また、ツメガエルアニマルキャップ細胞にアクチビンの投与量を変化させて処理することにより脊索、筋肉、間充織及び体腔上皮のようなほとんどの中胚葉組織を誘導することができること (Roux's Arch. Dev. Biol. 198, 330-335, 1990、Nature 347, 391-394, 1990、Roux's Arch. Dev. Biol. 200, 230-233, 1991)、及びアクチビンと共処理するレチノイン酸の投与量を変化させることにより、アニマルキャップ細胞から分化する脊索、筋肉及び前腎のような中胚葉組織を側後方化させること (Develop. Growth. Differ. 35, 123-128, 1993) が報告されている。

内胚葉性器官に対するレチノイン酸の作用については、発生段階 22~32 のツメガエル胚をレチノイン酸で処理すると、腸、肝臓、胃などの消化器官の形態が異常になると、Dixon らにより報告されているが、レチノイン酸で処理した発生段階 22~32 のツメガエル胚の膵臓は正常に形成され、内胚葉特異的マーカーである *XlHbox8* の発現にも影響がみられないことも報告されている (Dev. Genes Evol. 208, 318-326, 1998)。

また、オール・トランス(all-trans)・レチノイン酸は、細胞核内に存在する核内受容体・スーパーファミリー (Evans, R. M., Science, 240, p. 889, 1988) に属するレチノイン酸受容体 (RAR) にリガンドとして結合して、動物細胞の増殖・分化あるいは細胞死などを制御することが明らかにされている (Petkovich, M.,



et al., Nature, 330, pp. 444-450, 1987)。このオール・トランス・レチノイン酸を用いて、あるいはオール・トランス・レチノイン酸とアクチビンを組み合わせて用いることによって脾臓をインビトロで形成できることが知られている（特開 2001-299335 号公報及び特開 2001-333770 号公報）。

レチノイン酸の生理活性の発現については、レチノイドX受容体(RXR, 9-cis-レチノイン酸を天然リガンドとする：本化合物は RAR のリガンドでもある)の存在が証明されている。RXR は RAR と二量体を形成し、遺伝子の転写を惹起ないし抑制してレチノイン酸の生理活性の発現を調節していることが明らかにされている(Mangelsdorf, D. J. et al., Nature, 345, pp. 224-229)。RXR に結合可能なアゴニスト又はアンタゴニストが種々知られているが（アゴニストとしては、例えば特開平 10-59951 号公報に記載された HX600 など、アンタゴニストとしては同公報に記載された HX603 など）、RXR に結合するリガンドを用いて未分化細胞から器官を形成できるか否かは従来全く知られていない。

#### 発明の開示

本発明の課題は、脊椎動物の未分化細胞から所望の器官を形成する手段を提供することにある。本発明者らは、上記の課題を解決すべく鋭意研究を行った結果、RXR に結合するリガンドを用いて未分化細胞から心臓や神経などの器官を形成できることを見出した。また、本発明者らは、RAR リガンドとしてレチノイン酸受容体(RAR)サブタイプに実質的に結合しない RAR リガンドとアクチビンとを用いると、未分化細胞から高度に分化した脾臓を形成できることを見出した。本発明は上記の知見を基にして完成されたものである。

すなわち、本発明により、脊椎動物の未分化細胞から器官及び／又は組織をインビトロで形成する方法であって、脊椎動物の未分化細胞をレチノイン酸X受容体リガンドの存在下で培養する工程を含む方法が提供される。この発明の好ましい態様によれば、レチノイン酸X受容体リガンドがレチノイン酸X受容体のアゴニスト又はアンタゴニストである上記の方法、形成される器官及び／又は組織が

心臓、平滑筋組織、又は脂肪細胞組織である上記の方法が提供される。また、脊椎動物の未分化細胞から器官及び／又は組織をインビトロで形成するための分化誘導剤であって、レチノイン酸X受容体リガンドを含む分化誘導剤が本発明により提供される。

別の観点からは、脊椎動物の未分化細胞から膵臓をインビトロで形成する方法、又は脊椎動物の未分化細胞から膵臓の形態及び機能を有する組織をインビトロで形成する方法であって、脊椎動物の未分化細胞をレチノイン酸受容体サブタイプγに実質的に結合しないレチノイン酸受容体リガンド及びアクチビンの存在下で培養する工程を含む方法が提供される。この発明の好ましい態様によれば、上記のレチノイン酸受容体リガンドが 4-[(5, 6, 7, 8-テトラヒドロ-5, 5, 8, 8-テトラメチル-2-ナフタレニル) カルバモイル] 安息香酸である上記の方法が提供される。また、脊椎動物の未分化細胞から膵臓又は膵臓の形態及び機能を有する組織をインビトロで形成するための分化誘導剤であって、レチノイン酸受容体サブタイプγに実質的に結合しないレチノイン酸受容体リガンドを含む分化誘導剤も本発明により提供される。

また、別の観点からは、本発明により、上記の方法で形成された器官及び／又は組織が提供される。

#### 図面の簡単な説明

第1図は、ES細胞のコロニーを示した写真である。

第2図は、バクテリアディッシュで形成された胚様体を示した写真である。

第3図は、例1の方法で形成された心臓（心筋様細胞塊）を示した写真である。

第4図は、例2の方法で形成された平滑筋組織（平滑筋様細胞塊）を示した写真である。

第5図は、例2の方法で形成された脂肪細胞組織を示した写真である。

第6図は、例3の方法により胚葉体から分化誘導された膵臓導管や内分泌・外分泌細胞などを含む膵臓組織の写真である。

第7図は、例3の方法により誘導された膵臓の外分泌細胞を示した写真である。

第8図は、例3の方法により誘導された膵臓の $\beta$ 細胞（内分泌細胞）を示した写真である。

発明を実施するための最良の形態

本明細書において「器官及び／又は組織」とは、脊椎動物を構成する器官、組織、及びそれらの結合物を意味している。例えば、本発明の方法により形成される器官には、通常は組織として分類される構造物が結合している場合もあるが、そのような結合物を形成する方法も本発明の範囲に包含される。また、本発明の方法により同時に形成される器官及び組織はそれぞれ2種以上であってもよい。器官としては、例えば心臓、膵臓、腎臓などを例示することができ、組織としては神経組織、平滑筋組織、脂肪細胞組織などを例示することができるが、これらに限定されることはない。器官としては心臓又は膵臓などが好ましく、組織としては平滑筋組織又は脂肪組織などが好ましい。

レチノイン酸X受容体リガンド（以下、RXR リガンドと呼ぶ場合がある）には、レチノイン酸X受容体のアゴニスト（以下、RXR アゴニストと呼ぶ場合がある）及びレチノイン酸X受容体のアンタゴニスト（以下、RXR アンタゴニストと呼ぶ場合がある）が包含される。ある物質がRXR リガンドとなりうるか否かは、例えばBoehm, M. F., et al., J. Med. Chem., 37(18), 2930-2941, 1994; Heyman, R. A., et al., Cell, 68(2), 397-406, 1992; Levin, A. A., et al., Nature, 355(6358), 359-361, 1992; Chen, J. Y., et al., Nature, 382, 819-822, 1996などに記載された方法により当業者が容易に確認することができる。RXR リガンドとしては、例えば、特開平 9-100270 号公報、特開平 10-59951 号公報、特開平 10-114757 号公報、特開平 10-237050 号公報、特開平 10-338658 号公報、特開 2000-273079 号公報、国際公開 WO 99/24415 などに記載された化合物のうち RXR リガンドとして作用可能な化合物を用いることができるが、これらに限定されることはない。RXR リガンドは2種以上を組み合わせ用いてもよい。RXR アゴニス

トと RXR アンタゴニストとを組み合わせることも可能である。

より具体的には、RXR アゴニストとしては、例えば、

4-[5H-2, 3-(2, 5-ジメチル-2, 5-ヘキサノ)-5-メチルジベンゾ[b, e][1, 4]ジアゼピン-11-イル]安息香酸(HX600)；

4-[2, 3-(2, 5-ジメチル-2, 5-ヘキサノ)ジベンゾ[b, f][1, 4]チアゼピン-11-イル]安息香酸(HX630)；

4-[2, 3-(2, 5-ジメチ-2, 5-ヘキサノ)ジベンゾ[b, e]アゼピン-11-イル]安息香酸(HX640)；

4-[1, 3-ジヒドロ-7, 8-(2, 5-ジメチル-2, 5-ヘキサノ)-1-メチル-2-オキソ-2H-1, 4-ベンゾジアゼピン-5-イル]安息香酸(HX801)；

(Z)-5-[4-[N-メチル-(5, 6, 7, 8-テトラヒドロ-5, 5, 8, 8-テトラメチルナフタレン-2-イル)カルボキサミド]ベンジリデン]-2, 4-チアゾリジンジオン(TZ191)；

(Z)-5-[4-[N-メチル-N-(5, 6, 7, 8-テトラヒドロ-3, 5, 5, 8, 8-ペンタメチルナフタレン-2-イル)アミノ]ベンジリデン]-2, 4-チアゾリジンジオン(TZ335)；

4-[N-シクロプロピルメチル-N-(5, 6, 7, 8-テトラヒドロ-3, 5, 5, 8, 8-ペンタメチルナフタレン-2-イル)アミノ]安息香酸(DA124)；

2-[N-シクロプロピルメチル-N-(5, 6, 7, 8-テトラヒドロ-5, 5, 8, 8-テトラメチルナフタレン-2-イル)アミノ]ピリミジン-5-カルボン酸(PA024)；

4-[1-(5, 6, 7, 8-テトラヒドロ-5, 5, 8, 8-テトラメチルナフタレン-2-イル)-1, 3-ジオキサラン-1-イル]安息香酸(SR11237)；

4-[1-(5, 6, 7, 8-テトラヒドロ-3, 5, 5, 8, 8-ペンタメチルナフタレン-2-イル)エテン-1-イル]安息香酸(LGD1069)；及び

6-[1-(5, 6, 7, 8-テトラヒドロ-3, 5, 5, 8, 8-ペンタメチルナフタレン-2-イル)シクロプロプ-1-イル]ピリジン-3-カルボン酸(LG268)などを挙げる事ができる。

RXR アンタゴニストとしては、

4-(5H-2, 3-(2, 5-ジメチル-2, 5-ヘキサノ)-5-メチル-8-ニトリジベンゾ[b, e][1, 4]ジアゼピン-11-イル)安息香酸(HX531)；

4-[5H-2, 3-(2, 5-ジメチル-2, 5-ヘキサノ)-5-n-プロピルジベンゾ[b, e][1, 4]ジアゼピン-11-イル]安息香酸(HX603) ;

4-(5H-10, 11-ジヒドロ-2, 3-(2, 5-ジメチル-2, 5-ヘキサノ)-5, 10-ジメチル-8-フェニル-ジベンゾ[b, e][1, 4]ジアゼピン-11-イル)安息香酸(HX711) ;

2-[N-(3-n-ヘキシルオキシ-5, 6, 7, 8-テトラヒドロ-5, 5, 8, 8-テトラメチルナフタレン-2-イル)-N-メチルアミノ]ピリミジン-5-カルボン酸(PA452) ;

5-[4-(5, 6, 7, 8-テトラヒドロ-5, 5, 8, 8-テトラメチルナフタレン-2-yl)フェニル]トロポロン(Tp180) ;

(2E, 4E, 6Z)-3-メチル-7-(5, 6, 7, 8-テトラヒドロ-5, 5, 8, 8-テトラメチル-3-n-プロピルオキシナフタレン-2-イル)オクタ-2, 4, 6-トリエン酸(LG100754) ; 及び

4-[N-[3-(2-エチル-o-カルボラン-1-イル)フェニル]-N-メチルアミノ]安息香酸などが挙げられる。もともと、RXR アゴニスト及び RXR アンタゴニストはこれらの特定の化合物に限定されることはない。

本発明の方法に使用可能な脊椎動物の未分化細胞の種類は特に限定されないが、例えば、哺乳類動物のほか、鳥類、は虫類、両生類などの脊椎動物の未分化細胞を用いることができる。未分化細胞としては、胚性幹細胞、造血幹細胞、小腸クリプトの基底細胞などの幹細胞のほか、例えば中～後期の胚のアニマルキャップや胚様体(embryoid body)などの細胞集団を用いることもできる。本明細書において用いられる「未分化細胞」の用語は、2以上の細胞により形成される細胞集団や細胞塊を排除するものと解釈してはならない。

本発明の方法による器官及び／又は組織形成は、未分化細胞からの器官及び／又は組織形成方法として当業界で利用されている種々の方法で行うことができる。例えば、未分化細胞から脾臓を形成する方法について特開 2001-299335 号公報及び特開 2001-333770 号公報に詳細に記載されているので、当業者はこれらの刊行物を参照しつつ、本明細書の実施例の方法に従って、未分化細胞から所望の器官を形成させることができる。特開 2001-299335 号公報及び特開 2001-333770 号公報の開示のすべてを参照として本明細書の開示に含める。

例えば、胚性幹細胞から誘導した胚様体を用いて、適宜の濃度の RXR リガンドの存在下で 1 ないし数日培養することにより器官形成を行うことができる。RXR リガンドの存在下で 1 ないし数日培養した後、RXR リガンドの非存在下でさらに培養を継続してもよい。RXR リガンドの濃度は特に限定されないが、例えば  $1 \times 10^{-12} \sim 1 \times 10^{-3} \text{M}$  程度の範囲から適宜選択できる。本発明の方法はイン・ビトロの環境下で行うことができるが、本明細書においてイン・ビトロの用語は「生体外」の意味で用いられており、いかなる意味においても限定的に解釈してはならない。

例えば、胚性幹細胞 (ES 細胞) としては、Hooper によって樹立された 129 系マウスの E14 細胞 (ATCC #; CRL-1821) 又は Ledermann and Burki によって樹立された C57BL 系マウスの B6 (ATCC #; SCRC-1002) などを用いることができる。これらはマウス胚盤胞の内部細胞塊からライン化されたものである。もともと、胚性幹細胞の種類はこれらに限定されることはない。なお、通常の場合、胚性幹細胞の継代数は器官及び／又は組織形成能に影響を及ぼさない。

例えば、胚性幹細胞から誘導した胚様体をゼラチンコートした培養皿に接着させた後、RXR リガンドの溶液を必要に応じて培地で希釈して培地に加えて 1 から数日処理する。RXR リガンドを溶解するための溶媒としては、水、生理食塩水、緩衝液などのほか、ジメチルスルホキシドなどの有機溶媒又は水と有機溶媒との混合物を用いることもできる。胚様体の培養には、必要に応じてラミニン、コラーゲン I やマトリゲルコート (Biocoat, Becton Dickinson 社製) したマルチウェルプレートを用いることもできる。この処理後、一定時間後の細胞分化状態を記録することが望ましい。上記の処理の前後に、骨形成因子 (Bone morphogenic protein, BMP) である BMP2/4 や BMP6/7 のほか、FGF、アクチビン、フォリスタチン、ビデロゲニン、インスリン、グルカゴン、コンカナバリン、サイトカラシン、カドベリンなどの誘導因子、細胞増殖因子、又はサイトカイン類などを用いて処理することもできる。このような処理を採用することにより、器官及び／又は組織形成の方向性や形成率を高めることができる場合がある。

別の観点から提供される本発明の方法は、脊椎動物の未分化細胞から腭臓をイ

ンビトロで形成する方法、又は脊椎動物の未分化細胞から腭臓の形態及び機能を有する組織をインビトロで形成する方法であって、脊椎動物の未分化細胞をレチノイン酸受容体サブタイプ $\gamma$ に実質的に結合しないレチノイン酸受容体リガンド及びアクチビンの存在下で培養する工程を含むことを特徴としている。

レチノイン酸受容体 (RAR) リガンド (以下、RAR リガンドと呼ぶ場合がある) は、オールトランス-レチノイン酸または 9-シス-レチノイン酸が生理作用を発現するために必要な受容体に結合する性質を有する化合物である。本発明の方法には、好ましくはレチノイン酸受容体アゴニスト (以下、RAR アゴニストと呼ぶ場合がある) としてレチノイン酸に類似する作用 (例えば、細胞分化作用、細胞増殖促進作用、及び生命維持作用などの 1 種以上の作用) 又はその一部の作用を発揮する RAR リガンドを用いることができる。RAR リガンドであるか否かは、M. Sporn et al., *Retinoids*, Academic Press, 1984 に記載された種々の方法により容易に判定できる。本発明の方法で用いられる RAR リガンドは、RAR のサブタイプ $\alpha$  (RAR $\alpha$ ) 及びサブタイプ $\beta$  (RAR $\beta$ ) に結合し、かつサブタイプ $\gamma$  (RAR $\gamma$ ) には実質的に結合しない RAR リガンドである。レチノイン酸受容体・サブタイプへの結合については文献記載の方法により容易に確認することができる (H. de The, and A. Dejean, "Retinoids, 10 years on", Basel, Karger, pp. 2-9, 1991)。

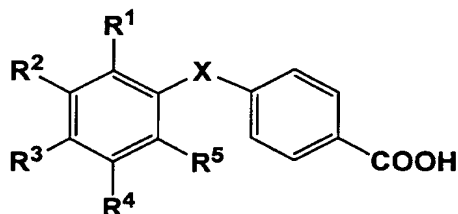
上記の性質を有する RAR リガンドとしては、例えば、フェニル置換カルバモイル安息香酸又はフェニル置換カルボキサミド安息香酸を基本骨格とする RAR アゴニストを用いることができる。フェニル置換カルバモイル安息香酸又はフェニル置換カルボキサミド安息香酸を基本骨格とする RAR リガンドは種々知られている。基本骨格という用語は、1 又は 2 以上の任意の置換基が結合するための主たる化学構造を意味する。通常は、カルバモイル基又はカルボキサミド基に置換するフェニル基が 1 個又は 2 個以上の置換基を有していることが好ましい。このような置換基としては、例えば、低級アルキル基を用いることができる (本明細書において低級とは炭素数 1 ないし 6 個程度、好ましくは炭素数 1 ないし 4 個を意味する)。低級アルキル基としては直鎖又は分枝鎖のアルキル基が好ましく、より具体

的には、メチル基、エチル基、n-プロピル基、イソプロピル基、n-ブチル基、sec-ブチル基、又は tert-ブチル基などを挙げる事ができる。

また、上記のフェニル基上の置換基として、例えば、メトキシ基などの低級アルコキシ基、ハロゲン原子（ハロゲン原子としてはフッ素原子、塩素原子、臭素原子、又はヨウ素原子のいずれでもよい）、例えばトリメチルシリル基などの低級アルキル置換シリル基などを挙げる事ができる。カルバモイル基に置換するフェニル基としては、例えば、2ないし4個の低級アルキル基で置換されたフェニル基、あるいは1又は2個のトリ低級アルキルシリル基で置換されたフェニル基などが好ましく、2ないし4個のアルキル基で置換されたフェニル基、又は2個のトリメチルシリル基で置換されたフェニル基などがより好ましい。

上記のフェニル基上に置換する2個の低級アルキル基が隣接する場合には、それらの2つの低級アルキル基は一緒になってそれらが結合するフェニル基の環構成炭素原子とともに5員環又は6員環を1個又は2個、好ましくは1個形成してもよい。このようにして形成される環は飽和でも不飽和でもよく、環上には1又は2個以上の低級アルキル基、例えばメチル基、エチル基などが置換していてもよい。上記の形成された環上には、好ましくは2～4個のメチル基、さらに好ましくは4個のメチル基が置換していてもよい。例えば、フェニル環上に置換する2個の隣接する低級アルキル基が一緒になって5,6,7,8-テトラヒドロナフタレン環や5,5,8,8-テトラメチル-5,6,7,8-テトラヒドロナフタレン環などが形成されることが好ましい。

好ましいRARリガンドとしては、例えば、下記の一般式(I)：





〔式中、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、及び  $R^5$  はそれぞれ独立に水素原子、低級アルキル基、又は低級アルキル置換シリル基を示し、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、及び  $R^5$  のうち隣接するいずれか2つの基が低級アルキル基である場合には、それらが一緒になってそれらが結合するベンゼン環上の炭素原子とともに5員環又は6員環を形成してもよく（該環は1又は2以上のアルキル基を有していてもよい）、Xは-CONH-又は-NHCO-を示す〕で表されるRARリガンドを挙げることができる。

上記一般式(I)において、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、及び  $R^5$  が示す低級アルキル基としては、炭素数1ないし6個程度、好ましくは炭素数1ないし4個の直鎖又は分枝鎖のアルキル基を用いることができる。例えば、メチル基、エチル基、*n*-プロピル基、イソプロピル基、*n*-ブチル基、*sec*-ブチル基、又は *tert*-ブチル基などを用いることができる。上記の低級アルキル基上には1個又は2個以上の任意の置換基が存在していてもよい。置換基としては、例えば、水酸基、低級アルコキシ基、ハロゲン原子などを例示することができる。 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、及び  $R^5$  が示す低級アルキル置換シリル基としては、例えば、トリメチルシリル基などを挙げることができる。

$R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、及び  $R^5$  からなる群から選ばれる隣接する2つの低級アルキル基が一緒になって、それらが結合するベンゼン環上の炭素原子とともに5員環又は6員環を1個又は2個、好ましくは1個形成してもよい。このようにして形成される環は飽和、部分飽和、又は芳香族のいずれであってもよく、環上には1又は2以上のアルキル基を有していてもよい。環上に置換可能なアルキル基としては、炭素数1ないし6個程度、好ましくは炭素数1ないし4個の直鎖又は分枝鎖のアルキル基を用いることができる。例えば、メチル基、エチル基などを用いることができ、好ましくは2～4個のメチル基、さらに好ましくは4個のメチル基が置換していてもよい。例えば、 $R^2$  及び  $R^3$  が置換するベンゼン環と  $R^2$  及び  $R^3$  とにより、5,6,7,8-テトラヒドロナフタレン環や5,5,8,8-テトラメチル-5,6,7,8-テトラヒドロナフタレン環などが形成されることが好ましい。

より具体的には、本発明の方法に好適に用いられるRARリガンドとして、

4-(2,4-ビストリメチルシリルフェニルカルボキサミド)安息香酸(Am555s, J. Med. Chem., 33, pp. 1430-1437, 1990)又は 4-[(5,6,7,8-テトラヒドロ-5,5,8,8-テトラメチル-2-ナフタレニル)カルバモイル]安息香酸(Am80, Hashimoto, Y., Cell struct. Funct., 16, pp. 113-123, 1991; Hashimoto, Y., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 166, pp. 1300-1307, 1990)などを挙げることができ、特に好ましいRAR リガンドはAm80である。

本発明の方法は、脊椎動物の未分化細胞を上記のRAR リガンド及びアクチビンの存在下で培養する工程を含んでいる。未分化細胞及び培養方法は上記に説明したものをを用いることができる。本発明の方法では、例えばアクチビン以外の誘導因子(例えば FGF)を用いる必要がなく、臍臓として実質的に完成された器官、又は臍臓の形態及び機能を実質的に有する高度に分化した組織が得られるという特徴がある。RAR リガンド及びアクチビンの組み合わせ濃度は適宜選択可能であるが、例えば、RAR リガンドの濃度を  $1 \times 10^{-12} \sim 1 \times 10^{-3}$  M 程度の範囲とし、アクチビンの濃度を 0.1~1000 ng/ml 程度の範囲とすることができる。また、より複雑な構造を有する器官の形成のために、RAR リガンドと RXR リガンドとを組み合わせ用いることもできる。

本発明の方法により形成された器官及び／又は組織は、その器官及び／又は組織を直接又は間接の作用点とする医薬のスクリーニングに用いることができる。例えば、本発明の方法により心臓を形成させた場合、形成された心臓は長期に渡って一定の拍動リズムを有するが、例えばこの心臓を用いて心拍数の増減に作用する医薬をスクリーニングすることが可能である。

#### 実施例

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は下記の実施例に限定されることはない。

### 例1：RXR リガンドを用いた心臓の形成

ES 細胞として 29 系マウスの E14 細胞 (ATCC #; CRL-1821) 又は C57BL 系マウスの B6 (ATCC #; SCRC-1002) を用いた。0.1% のゼラチンでコートした培養皿に 13 日胚のマウスから作成したマウス胎児繊維芽細胞を播種し、12% 牛胎児血清 (Giboco), 100 U/ml ペニシリン (Sigma), 100  $\mu$ g/ml ストレプトマイシン (Sigma) を含む培地で 24 時間培養した。この細胞を 10  $\mu$ g/ml のマイトマイシン C (MMC; Sigma) で 4 時間処理し細胞分裂を阻害した後、リン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate buffered saline, PBS) で 2 回洗浄して MMC を取り除いた。この繊維芽細胞 (フィーダー) の上に ES 細胞を播種した。ES 細胞用培地としては、15% ES 用牛胎児血清 (Giboco)、2 mM L-グルタミン (Gibco)、MEM non-essential amino acid (Sigma)、1 mM ピルビン酸ナトリウム (Giboco)、0.0007%  $\beta$ -メルカプトエタノール (Sigma)、1000 U/ml Leukemia inhibiting factor (Chemicon)、100 U/ml ペニシリン (Sigma)、100  $\mu$ g/ml ストレプトマイシン (Sigma) を含む D-MEM (高グルコース, Giboco) を用い、CO<sub>2</sub> インキュベーター (5% CO<sub>2</sub>、100% 湿度) で 37°C で培養し、培地交換は毎日行った。

継代培養は、ES 細胞を播種してから 72 時間後に行った。ゼラチンコートした培養皿に、MMC 処理したフィーダー細胞 (マウス胎児繊維芽細胞) を 24 時間前に播種しておき、この上に 0.05% トリプシン-0.02% EDTA 処理によって完全に解離した ES 細胞を播種し、コロニーを形成させた (第 1 図参照)。ES 細胞を播種してから 3 日間培養してコロニーを形成させ、このコロニーをピペッティングによって単離した後、細胞接着性の非常に弱いバクテリア用培養皿に播種した。培地としては 15% Knockout SR (KSR, Giboco), 100 U/ml ペニシリン, 100  $\mu$ g/ml ストレプトマイシンを含む D-MEM (高グルコース) を用いた。この状態でさらに 3 日間培養することにより胚様体を作成した (第 2 図)。

この胚様体を 0.1% のゼラチンコートした 24 ウェルプレート (TPP 社製) に 4~6 個ずつ播種し、RXR リガンドとして  $1 \times 10^{-5}$  M の PA024 (2-[N-シクロプロピルメチル-N-(5,6,7,8-テトラヒドロ-5,5,8,8-テトラメチルナフタレン-2-イル)ア

ミノ]ピリミジン-5-カルボン酸)を添加して2日間培養した。処理開始時を0時間として48~72時間後に自律的に拍動する心筋様細胞の細胞塊が形成された(第3図)。この細胞塊の出現頻度は、0.2細胞塊/胚様体であり、未処理群又は $1 \times 10^{-5}$  M オールトランスレチノイン酸で処理した対照群では、処理後2週間以内ではほとんど心筋様細胞の分化は認められないため、有意にPA024が作用していると考えられた。一方、 $2 \times 10^{-6}$  M のPA024で処理した胚様体では、出現時期は遅れるものの心筋様細胞塊の出現頻度が高く、72~96時間で0.5細胞塊/胚様体の形成が認められた。これらの細胞塊は、骨格筋様細胞のように繊維状構造を取らず、細胞塊を形成して自立的拍動を続けた。

#### 例2：RXRリガンドを用いた平滑筋及び脂肪細胞の形成

例1と同様にして $1 \times 10^{-5} \sim 2 \times 10^{-6}$  M のPA024で処理後、培養をさらに続けると約1~2週間で平滑筋様細胞が形成された。この細胞塊は、ゆっくりとしたぜん動運動を示した。頻度は0.1~0.2細胞塊/胚様体であった(第4図)。また、2週間程度で脂肪細胞が出現し始め、20日間培養し続けると全体の30~40%程度が脂肪細胞となった。胚様体あたりの数値に換算するとほぼ100%であった。対照群( $1 \times 10^{-5}$  M のオールトランスレチノイン酸処理)と比較してPA024処理群では形成された脂肪細胞の量は2~3倍多かった(第5図)。

#### 例3：RARリガンドであるAm80とアクチビンとの組み合わせによる脾臓の形成

0.1%ゼラチンで一晩コートした培養用10 cmディッシュ(TPP)に、マイトマイシン-C処理( $10 \mu\text{g/ml}$ 、3 hr)して細胞分裂を阻害したマウス胚繊維芽細胞(primary mouse embryonic fibroblast、PMEF)を播種し、1日以上培養してフィーダーレイヤーとして用いた。マウスES細胞として広く用いられているES-E14TG2a(ATCC #CRL-1821)をフィーダーレイヤー上に播種し、培養を行った。ES細胞用培地は、15%牛胎児血清(FBS、Gibco)、非必須アミノ酸、0.007%  $\beta$ -メルカプトエタノール、1000 U/ml Leukemia inhibiting factor (Chemicon)、100 U/ml

ペニシリン、及び 0.1 mg/ml ストレプトマイシンを含む DMEM (高グルコース、Gibco) 中で行った。培地交換は毎日行なった。

上記の ES 細胞を播種して 72 時間後にコロニーから EB を形成した。ES 細胞のコロニーを Dulbecco の PBS で 1 回洗った後、1 mg/ml コラーゲナーゼ/ディスパーゼ (Roche) を 10cm ディッシュ 1 枚あたり 1 ml ずつ加え、室温で 30~40 秒処理した。約 50% のコロニーが溶液中に浮き上がってきたところで Embryoid medium (EM)、15% Knockout Serum Replacement (KSR、Gibco)、100 U/ml ペニシリン、0.1 mg/ml ストレプトマイシンを含む DMEM (高グルコース) を 10cm の培養用ディッシュ 1 枚あたり 13 ml 加えてコロニーを回収した。ES 細胞のコロニーに物理的ダメージを与えないようにしながらメディアムごと 15ml チューブに集め、約 5 分静置した。コロニーが沈殿したところで培地を除き、EM に再懸濁した。この ES コロニーを低接着性の培養 10 cm ディッシュ (Corning または Nunc) に播種して浮遊系で培養を続けた。培地交換は 2 日に 1 回行い、4 日目に胚葉体 (EB) として実験に用いた。

EBs 形成開始から 96 時間後に実体顕微鏡で観察しながら直径 500  $\mu$ m 前後の EBs を低接着性の 24 ウェルプレート (Corning または Nunc) に 100  $\mu$ l の培地と共に 1 ウェルあたり 1 個ずつ移した。その後で 900  $\mu$ l のアクチビン/Am80 (4-[(5, 6, 7, 8-テトラヒドロ-5, 5, 8, 8-テトラメチル-2-ナフタレニル) カルバモイル] 安息香酸) を含む分化誘導培地: 15% KSR, 10 ng/ml アクチビン、0.1  $\mu$ M Am80、0.1% BSA、100 U/ml ペニシリン、0.1 mg/ml ストレプトマイシンを含む DMEM (高グルコース) を加えて 48 時間培養を続けた。

分化誘導培地で 48 時間 EB 処理した後 (EBs 形成 6 日後)、実体顕微鏡で観察しながら EBs を 0.1% ゼラチンで一晩コートした 24 ウェル組織培養プレート (TPP) に移し、10% KSR、100 U/ml ペニシリン、0.1 mg/ml ストレプトマイシンを含む DMEM (高グルコース) 中で 3 日に一度、培地交換をして培養を続けた。

培養 12 日目 (EB 形成開始からの日数) から 16 日目に腸管様構造が誘導形成され、この誘導形成はアクチビン/Am80 処理した EB のうち 60~70% の割合で認めら

れた。培養 21 日前後になると、その腸様構造が認められた EB のうち約 60%に膵臓組織特異的構造や特異的に分化した細胞が形成された。この膵臓組織では、膵臓導管構造の形成と共に、アミラーゼ分泌顆粒を含む多くの外分泌細胞やインスリンやグルカゴンを産性する内分泌細胞の形態が認められた。胚葉体から分化誘導された膵臓導管や内分泌・外分泌細胞を含む膵臓組織の写真を第 6 図に示す。第 7 図は誘導された膵臓の外分泌細胞を示した写真であり、第 8 図は誘導された膵臓の  $\beta$  細胞（内分泌細胞）を示した写真である。また抗インスリン抗体や抗アミラーゼ抗体陽性であり、RT-PCR 法による解析では培養 10 日目から 14 日目には PDX-1 や PAX-4、NGN-3 などの膵臓特異的転写因子の発現が持続して観察された。

#### 産業上の利用可能性

本発明の方法により、脊椎動物の未分化細胞から所望の器官、例えば心臓や神経、あるいは膵臓などの器官を形成する手段が提供される。

## 請求の範囲

1. 脊椎動物の未分化細胞から器官及び／又は組織をインビトロで形成する方法であって、脊椎動物の未分化細胞をレチノイン酸X受容体リガンドの存在下で培養する工程を含む方法。

2. レチノイン酸X受容体リガンドがレチノイン酸X受容体のアゴニスト又はアンタゴニストである請求の範囲第1項に記載の方法。

3. レチノイン酸X受容体リガンドが下記の群：

4-[5H-2, 3-(2, 5-ジメチル-2, 5-ヘキサノ)-5-メチルジベンゾ[b, e][1, 4]ジアゼピン-11-イル]安息香酸、4-[2, 3-(2, 5-ジメチル-2, 5-ヘキサノ)ジベンゾ[b, f][1, 4]チアゼピン-11-イル]安息香酸、4-[2, 3-(2, 5-ジメチ-2, 5-ヘキサノ)ジベンゾ[b, e]アゼピン-11-イル]安息香酸、4-[1, 3-ジヒドロ-7, 8-(2, 5-ジメチル-2, 5-ヘキサノ)-1-メチル-2-オキソ-2H-1, 4-ベンゾジアゼピン-5-イル]安息香酸、(Z)-5-[4-[N-メチル-(5, 6, 7, 8-テトラヒドロ-5, 5, 8, 8-テトラメチルナフタレン-2-イル)カルボキサミド]ベンジリデン]-2, 4-チアゾリジンジオン、(Z)-5-[4-[N-メチル-N-(5, 6, 7, 8-テトラヒドロ-3, 5, 5, 8, 8-ペンタメチルナフタレン-2-イル)アミノ]ベンジリデン]-2, 4-チアゾリジンジオン、4-[N-シクロプロピルメチル-N-(5, 6, 7, 8-テトラヒドロ-3, 5, 5, 8, 8-ペンタメチルナフタレン-2-イル)アミノ]安息香酸、2-[N-シクロプロピルメチル-N-(5, 6, 7, 8-テトラヒドロ-5, 5, 8, 8-テトラメチルナフタレン-2-イル)アミノ]ピリミジン-5-カルボン酸、4-[1-(5, 6, 7, 8-テトラヒドロ-5, 5, 8, 8-テトラメチルナフタレン-2-イル)-1, 3-ジオキソラン-1-イル]安息香酸、4-[1-(5, 6, 7, 8-テトラヒドロ-3, 5, 5, 8, 8-ペンタメチルナフタレン-2-イル)エテン-1-イル]安息香酸、6-[1-(5, 6, 7, 8-テトラヒドロ-3, 5, 5, 8, 8-ペンタメチルナフタレン-2-イル)シクロプロプ-1-イル]ピリジン-3-カルボン酸、4-(5H-2, 3-(2, 5-ジメチル-2, 5-ヘキサノ)-5-メチル-8-ニトロジベンゾ[b, e][1, 4]ジアゼピン-11-イル)安息香酸、4-[5H-2, 3-(2, 5-ジメチル-2, 5-ヘキサノ)-5-n-プロピルジベンゾ[b, e][1, 4]ジアゼピン-11-イル]安息香酸、

4-(5H-10, 11-ジヒドロ-2, 3-(2, 5-ジメチル-2, 5-ヘキサノ)-5, 10-ジメチル-8-フェニル-ジベンゾ[b, e][1, 4]ジアゼピン-11-イル)安息香酸、2-[N-(3-n-ヘキシルオキシ-5, 6, 7, 8-テトラヒドロ-5, 5, 8, 8-テトラメチルナフタレン-2-イル)-N-メチルアミノ]ピリミジン-5-カルボン酸、5-[4-(5, 6, 7, 8-テトラヒドロ-5, 5, 8, 8-テトラメチルナフタレン-2-yl)フェニル]トロポロン、(2E, 4E, 6Z)-3-メチル-7-(5, 6, 7, 8-テトラヒドロ-5, 5, 8, 8-テトラメチル-3-n-プロピルオキシナフタレン-2-イル)オクタ-2, 4, 6-トリエン酸(LG100754)、及び 4-[N-[3-(2-エチル-o-カルボラン-1-イル)フェニル]-N-メチルアミノ]安息香酸からなる群から選ばれる請求の範囲第2項に記載の方法。

4. 形成される器官及び／又は組織が心臓、平滑筋組織、又は脂肪細胞組織である請求の範囲第1項ないし第3項のいずれか1項に記載の方法。

5. 請求の範囲第1項ないし第4項のいずれか1項に記載の方法により形成された器官及び／又は組織。

6. 脊椎動物の未分化細胞から器官及び／又は組織をインビトロで形成するための分化誘導剤であって、レチノイン酸X受容体リガンドを含む分化誘導剤。

7. 脊椎動物の未分化細胞から膵臓をインビトロで形成する方法、又は脊椎動物の未分化細胞から膵臓の形態及び機能を有する組織をインビトロで形成する方法であって、脊椎動物の未分化細胞をレチノイン酸受容体サブタイプ $\gamma$ に実質的に結合しないレチノイン酸受容体リガンド及びアクチビンの存在下で培養する工程を含む方法。

8. レチノイン酸受容体リガンドが 4-[(5, 6, 7, 8-テトラヒドロ-5, 5, 8, 8-テトラメチル-2-ナフタレニル)カルバモイル]安息香酸である請求の範囲第7項に記載の方法。

9. 脊椎動物の未分化細胞から膵臓をインビトロで形成するための、又は脊椎動物の未分化細胞から膵臓の形態及び機能を有する組織をインビトロで形成するための分化誘導剤であって、レチノイン酸受容体サブタイプ $\gamma$ に実質的に結合しないレチノイン酸受容体リガンドを含む分化誘導剤。



## 要 約 書

脊椎動物の未分化細胞から器官及び／又は組織をインビトロで形成する方法であって、脊椎動物の未分化細胞をレチノイン酸X受容体リガンド（例えばレチノイン酸X受容体のアゴニスト又はアンタゴニスト）の存在下で培養する工程を含む方法、及び脊椎動物の未分化細胞から腭臓をインビトロで形成する方法、又は脊椎動物の未分化細胞から腭臓の形態及び機能を有する組織をインビトロで形成する方法であって、脊椎動物の未分化細胞をレチノイン酸受容体サブタイプγに実質的に結合しないレチノイン酸受容体リガンド及びアクチビンの存在下で培養する工程を含む方法。

第1図

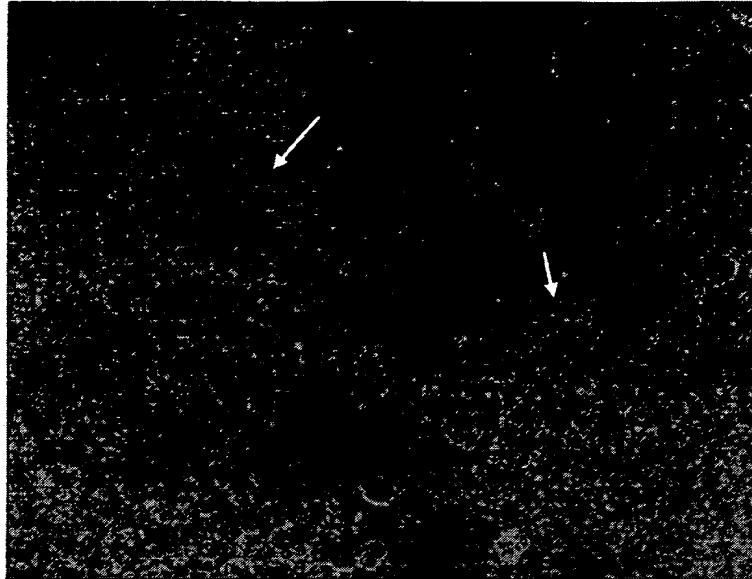


BEST AVAILABLE COPY

第2図

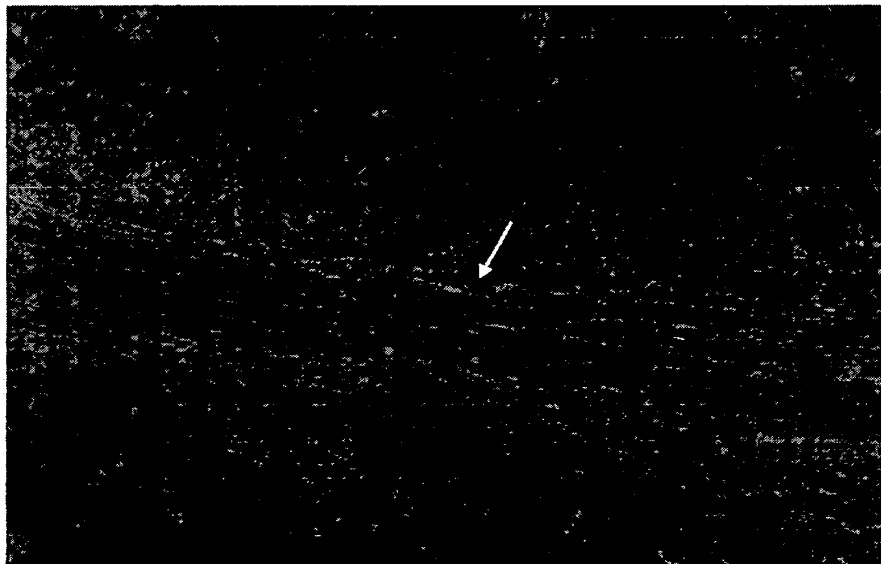


第3図

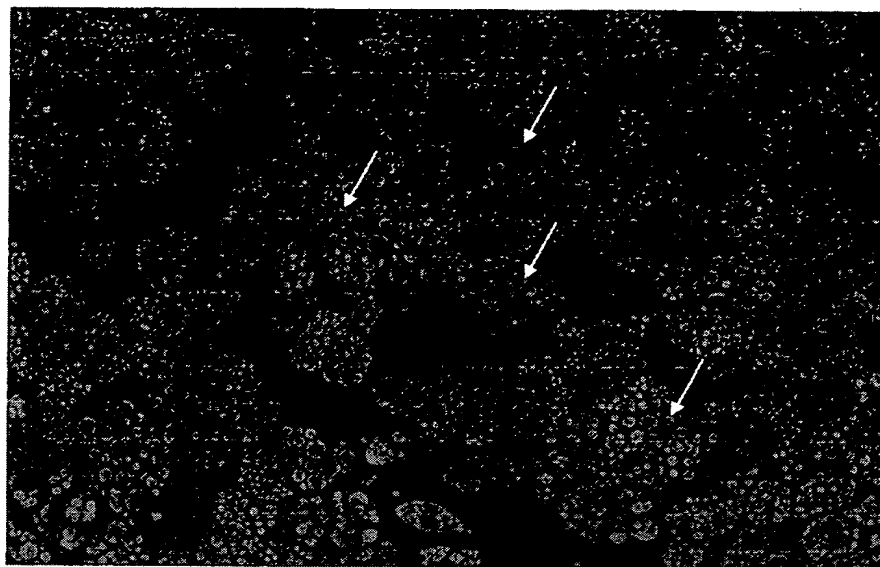


BEST AVAILABLE COPY

第4図



第5図

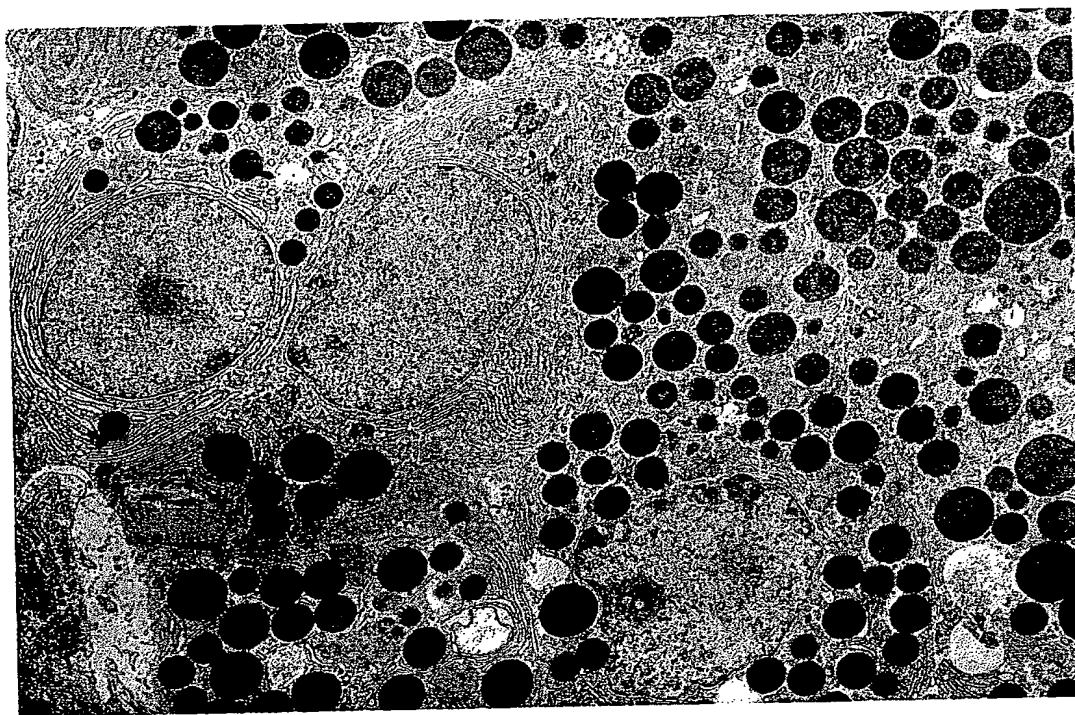


BEST AVAILABLE COPY

第6図



第7図



BEST AVAILABLE COPY

第8図

